

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-127294

(43)公開日 平成10年(1998)5月19日

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	F I
C 12 N 15/09	ZNA	C 12 N 15/00
C 07 K 14/39		C 07 K 14/39
C 12 N 1/19		C 12 N 1/19
9/90		9/90
// (C 12 N 15/09	ZNA	

審査請求 未請求 請求項の数10 FD (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-237822

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(22)出願日 平成9年(1997)8月20日

(72)発明者 阪井 康能

滋賀県大津市本宮2-40-8

(31)優先権主張番号 特願平8-234287

(72)発明者 加藤 譲夫

京都府亀岡市西つつじヶ丘美山台2-3-

(32)優先日 平8(1996)9月4日

18

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(72)発明者 柴野 裕次

大阪府豊中市刀根山4-5-23

(74)代理人 弁理士 石田 敏 (外3名)

(54)【発明の名称】 メタノール酵母由來のプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子

(57)【要約】

【課題】 新規なプロテインジスルフィドイソメラーゼ及びそれをコードする遺伝子の提供。

【解決手段】 配列番号1に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由來の蛋白質、ならびにそれらをコードする遺伝子。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由来の蛋白質、又は該アミノ酸配列に対して1個又は数個のアミノ酸の欠失、付加又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項2】 Cys-Gly-Ile-Cys (配列番号: 4) からなる活性中心の保存領域とArg-Asp-Glu-Leu (配列番号: 9) からなる小胞体保持シグナル配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由来の蛋白質。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項4】 配列番号1に記載の塩基配列で表される請求項3記載の遺伝子。

【請求項5】 請求項3又は4記載の遺伝子を含んで成るベクター。

【請求項6】 請求項5に記載のベクターにより宿主を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項7】 前記宿主がメタノール酵母である請求項6記載の形質転換体。

【請求項8】 前記メタノール酵母がキャンディダ・ボイディニ (*Candida boidinii*) である請求項7に記載の形質転換体。

【請求項9】 請求項6ないし8に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体からプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。

【請求項10】 請求項5に記載のベクターと異種構造遺伝子を含むベクターとを用いて宿主を共形質転換し、得られる形質転換体を培養し、該培養物から該異種構造遺伝子の発現生産物であるペプチド又は蛋白質を採取することを特徴とする該異種構造遺伝子によりコードされるペプチド又は蛋白質の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、タンパク質中のジスルフィド結合の形成を触媒することにより、タンパク質の高次構造形成を促進する酵素であるプロテインジスルフィドイソメラーゼおよびその遺伝子に関する。とりわけ、プロテインジスルフィドイソメラーゼの中でも、異種遺伝子の分泌発現の効率が高く有用タンパク質の工業的生産に好適な微生物であるメタノール酵母由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼおよびその遺伝子に関する。

## 【0002】

【従来の技術】プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI; Protein Disulfide Isomerase) は小胞体

(以下ERと記載する) 内腔の主要タンパク質であり、還元したRNAseを酸化的にリフォルディングする活性として最初に見いだされた (Goldberger, R.F. et al. (1963) J. Biol. Chem. 238, 628-635)。PDIは分泌タンパク質のジスルフィド結合を組み換えることにより安定な高次構造の形成を触媒している酵素であると考えられている。

【0003】異種タンパク質、とりわけジスルフィド結合を持つことの多い分泌タンパク質の場合、PDIによるジスルフィド結合の組み換えが、ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ (PPI; Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase) によるタンパク質のフォルディングと共に、タンパク質の分泌過程における律速段階であることが指摘されている (Gething, M.J. and Sambrook, J. (1992) Nature 355, 33-45)。また、in vitroにおいてもPDIが、RNAseなどの單一ドメインからなるタンパク質のフォルディングを促進することが示されている (Jaenicke, R. (1993) Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 104-102)。

【0004】一方、メタノール酵母はメタノールを唯一炭素源として生育し、菌体収率も高いことから、ホルムアルデヒドなどのアルデヒド類、エポキサイド、メチルケトン、ギ酸などの合成化学工業原料の製造に用いられてきた。また、菌体そのものをタンパク質源として利用することや、菌体成分であるアミノ酸、ビタミン等の生産に利用することも研究され、実用化されているものもある。また、最近になってメタノール酵母を宿主とした異種遺伝子の発現系が開発され、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 酵母よりも高い生産性を有することが示されている (特開平5-344895)。

【0005】特に分泌タンパク質の場合にはその生産性は高く、例えばリゾプス属糸状菌由来のグルコアミラーゼの場合、3.4g/lとサッカロマイセス酵母に比較して約10倍の生産性を示した (Sakai, Y., et al. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1308, 81-87)。なお、メタノール酵母としては、キャンディダ・ボイディニ (*Candida boidinii*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 等が知られている。

【0006】遺伝子組換え技術によって異種タンパク質の分泌生産を行う場合、タンパク質のフォルディングの速度を速めることにより、分泌効率が向上すると考えられる。このような考えを基に、ヒトPDIの遺伝子をサッカロマイセス酵母中で目的遺伝子と共に共発現させることにより、ヒト血清アルブミンの分泌量を平均で60%増加させた例が開示されている (特開平6-38771)。

【0007】タンパク質の適切なフォルディングのために必要とされるジスルフィド結合の形成や交換には適切な環境が必要で、そのためには真核生物細胞ではERやゴ

ルシ装置などの細胞内コンパートメントを持っており、分泌タンパク質はこのような細胞内オルガネラの中を移行しながら、適切なフォルディングや糖鎖付加を受けて、エキソサイトーシスによって細胞外に分泌される。真核生物の分泌タンパク質は分子内ジスルフィド結合を持ったものが多く、ER内で起こるジスルフィド結合の形成や交換反応は、そのタンパク質の高次構造形成や分泌に必須である。

【0008】従って、ジスルフィド結合の形成や交換反応を触媒するPDIは、ER内に局在化あるいは残留することが必要で、このために小胞体保持シグナルとよばれる特有のアミノ酸配列をC末端に持っている。小胞体保持シグナルの配列としては、動物ではLys-Asp-Glu-Leu（配列番号：2）、サッカロマイセス酵母ではHis-Asp-Glu-Leu（配列番号：3）が知られている。上記記載のヒトPDI遺伝子をサッカロマイセス酵母で発現させた場合、ヒトPDIのER保持シグナルがサッカロマイセス酵母で十分機能せず、PDIのER内局在化が十分果たせなかつたと考えられる。このためにPDI遺伝子を高発現させても、それに見合ったER内のPDI活性の上昇が起こらず、共発現させた分泌タンパク質の分泌量の増大が60%という値に留まつたと考えられる。

【0009】メタノール酵母で発現させたPDIが十分機能を発揮するためには、メタノール酵母由来のPDIを利用するのが望ましい。また、メタノール酵母が前述の如くタンパク質分泌能が高いのは、タンパク質分泌過程の律速段階であるPDIによるジスルフィド結合の組み換えが効率よく行われているためと考えられ、メタノール酵母由来のPDIは他起源のPDIに比較して比活性が高い。ER内の活性が高いと考えられる。しかしながらメタノール酵母のPDIおよびその遺伝子については未だ知られていない。従ってそれを利用したメタノール酵母分泌発現系における生産性の向上についても、何ら検討されていない。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、メタノール酵母が持つPDI遺伝子をクローニングし、その塩基配列を明らかにして、メタノール酵母のPDIの特徴を解明すべく鏡意研究を行つた。すなわち、本発明の目的は、メタノール酵母における異種タンパク質の分泌生産をより効率的に行うために、メタノール酵母由来のPDI遺伝子を提供することにある。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために、PDIの活性部位にある保存領域のアミノ酸配列を基に合成したオリゴスクレオチドをプライマーとして、PCRにより増幅DNA断片を得た。この増幅DNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション法によって、メタノール酵母キャンディグ・ボイディニ（*Candida boidinii*）のPDI遺伝子をク

ローニングし、当該遺伝子の塩基配列および当該PDIのアミノ酸配列を明らかにした。さらに、当該PDI遺伝子で形質転換したメタノール酵母中で、糸状菌由來のペルオキシダーゼ遺伝子を共発現させることにより当該ペルオキシダーゼの分泌発現量を約10倍増加させ、本発明を完成した。

【0012】従つて、本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由來の蛋白質、又は該アミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由來の蛋白質を提供する。本発明はさらに、Cys-Gly-His-Cys（配列番号：4）を含む活性中心の保存領域とArg-Asp-Glu-Leu（配列番号：9）からなる小胞体保持シグナル配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由來の蛋白質を提供する。

【0013】本発明はまた、PDIをコードする遺伝子、該遺伝子を含んで成るベクター、該ベクターにより形質転換された宿主、および該形質転換宿主を用いてPDIを製造する方法、並びに前記ベクターと目的タンパク質をコードする遺伝子を含有するベクターとで共形質転換された宿主、および該共形質転換宿主酵母において目的分泌タンパク質遺伝子を共発現させることにより目的タンパク質を著量分泌する方法を提供する。

#### 【0014】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。まず、ジスルフィド結合交換反応の活性中心として各種起源のPDIで保存されている配列、Cys-Gly-His-Cysをサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のPDIアミノ酸配列中に2カ所見いだした。この配列を含む*S. cerevisiae*のPDIアミノ酸配列とともに、メタノール酵母のコドン使用頻度を参考にして各種のPCR用プライマーを設計した。これらのプライマーを用いてメタノール酵母のゲノムDNAを綫型にしてPCR反応を行い、得られたPCR反応生成物の塩基配列から推定されるアミノ酸配列が、*S. cerevisiae*のPDIアミノ酸配列と類似性を持っていることを確認した。

【0015】メタノール酵母のゲノムDNAを各種制限酵素で完全分解し、アガロース電気泳動により分画する。上記記載のPCR産物をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行い、PDI遺伝子の全領域を含み、最小のDNA断片を生じる制限酵素を知る。その制限酵素で完全分解したメタノール酵母のゲノムDNAを用いてゲノムライブラーを作成し、上記記載のPCR産物をプローブにしたコロニーハイブリダイゼーションによってPDI遺伝子を持ったクローンを選択する。

【0016】選択したクローンからプラスミドを抽出

し、サザンハイブリダイゼーション解析によって、上記記載のPCR産物の配列を含んでいることを確認する。さらに、このプラスミドの挿入断片の制限酵素地図を作成し、これを基にサブクローニングを行いPDI遺伝子を含む最小のDNA断片を取得する。取得したDNA断片の塩基配列を決定し、メタノール酵母由来PDIのアミノ酸配列を解析する。

【0017】このようにして得られたメタノール酵母由来PDI遺伝子をメタノール酵母で高発現させ、PDIを製造することができる。PDI遺伝子の発現ベクターとしては公知のものが使用できるが、メタノール酵母キヤンディダ・ボイディニの発現ベクターとしては特開平5-344895に記載のpNUTE1やpTRExが利用できる。メタノール酵母の形質転換法および外来遺伝子が染色体DNAに組み込まれた形質転換体の取得法は、公知の方法 (Sakai, Y. et al., (1991) J. Bacteriol., 173, 7458 ~7463) が利用できる。また、メタノール酵母由来PDI遺伝子を、目的分泌タンパク質遺伝子と共にメタノール酵母細胞内で共発現させることにより、目的分泌タンパク質の分泌量を増大させることができる。

【0018】メタノール酵母C. boidinii 由来のPDIは、Arg-Asp-Glu-Leu (配列番号: 9) というサッカロマイセス酵母のHis-Asp-Glu-Leu (配列番号: 3) とは異なる小胞体保持シグナルを持っていたが、自分自身のものである以上C. boidiniiの細胞に認識されて、PDIがERに保持されてその機能を十分発揮することは間違いない。PDIの発現に用いる発現ベクターは、上記記載のpNUTE1やpTRExの栄養用要求性マーカーを、目的タンパク質の発現ベクターに用いたものとは異なる遺伝子に変えたものを用いることができる。また、宿主メタノール酵母に2つの発現ベクターのマーカーに対応した栄養要求性を付与することにより、上記記載の方法で形質転換が可能である。また、メタノール酵母へ栄養要求性を附加する方法については、公知の方法 (Sakai, Y. et al., (1991) J. Bacteriol., 173, 7458 ~7463) が利用できる。

【0019】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1. キャンディダ・ボイディニ (*Candida boidinii* S2株 (Tani, Y., et al., (1985) Agric. Biol. Chem., 49, 2699 ~2706) より、PDI遺伝子の取得、およびその塩基配列の決定を行った。なお、当該株は*Candida boidinii* SAM1958と命名され、工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号：微工研案寄第3766号 (FERM BP-3766) として1992年2月25日に寄託されている。

【0020】(1) PCRによる増幅

ジスルフィド結合交換反応の活性中心として各種起源のPDIで保存されている配列、Cys-Gly-His-Cys (配列

番号: 4) に関する *S. cerevisiae* のPDI中のアミノ酸配列として以下の2つの配列に注目した。

Pro-Trp-Cys-Gly-His-Cys-Lys (配列番号: 5) (サッカロマイセス酵母のPDIにおけるアミノ酸配列番号59 ~65番目のアミノ酸)

Tyr-Ala-Pro-Trp-Cys-Gly-His (配列番号: 6) (サッカロマイセス酵母のPDIにおけるアミノ酸配列番号402 ~408番目のアミノ酸)

C. boidinii コドン使用類度を参考にして、このアミノ酸配列に対応する以下のような塩基配列のオリゴスクレオチドを合成した。

【0021】すなわち、センスプライマーとして、  
5'-CCGGAATTCCCT(A) TGG TGT(C) GGT(A) CAT(C) TGT  
(C) AA-3' (配列番号: 7)

アンチセンスプライマーとして、

5'-CGCGGATCC TG A(T) CC A(G) CA CCA A(T) GG A(G/T) GC  
A(G) T-3' (配列番号: 8)

を合成した。これらのオリゴスクレオチドの5'末端にはEcoRI およびBamHI の認識する配列がそれぞれあり、この2つのプライマーで増幅されたDNA断片の5'末端にはEcoRI サイトが、3'末端にはBamHI サイトが形成されるようになっている。

【0022】C. boidinii のゲノムDNAを錆型にして、上記記載の2つのオリゴスクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行ったところ、約1kbの増幅DNA断片が認められた。この増幅断片を回収し、制限酵素EcoRI 消化によって得られた約250bpのDNA断片を、EcoRI 消化したpBluescript II SK+に挿入した。挿入断片の塩基配列を解析したところ、*S. cerevisiae* PDIのアミノ酸配列と高い相同意を持ったアミノ酸配列をコードする塩基配列が認められたので、このDNA断片をC. boidinii のPDI遺伝子の一部であると断定した。

【0023】(2) ゲノムDNAのサザーンハイブリダイゼーション解析

キャンディダ・ボイディニ S2株の菌体よりゲノムDNAを単離した。DNAの単離法としては、例えばクリエルらの方法 (Cryer, D.R. et al., (1975) Meth. Cell. Biol., 12, 39~44) が挙げられる。キャンディダ・ボイディニ S2株のゲノムDNAを各種制限酵素で切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動で分離した。分離したDNAをゲルからナイロンメンブレン (アマシャム社製) に転写、固定した。上記記載のPDI遺伝子を含む250bp DNA断片をランダムプライマー・キット (アマシャム社製) を用いて、32Pで標識した。

【0024】標識したDNA断片を、5×SSC-1%SDS-1×Denzhardt 液に加えハイブリダイゼーション溶液を作成した。DNAを固定したナイロンメンブレンにこのハイブリダイゼーション溶液を加え、プラスチックバッグに封入した。封入したナイロンメンブレンを65°C、16

時間インキュベートした後、ナイロンメンブレンをプラスチックバッグから取り出して、2×SSC-0.1%SDS溶液にて室温で洗った。次にナイロンメンブレンを0.2×SSC-0.1%SDS溶液中で65°C、30分間インキュベートした後、溶液を新しいものに変え、65°C、30分間のインキュベーションを繰り返した。メンブレンを2×SSCで洗った後、風乾してオートラディオグラフィーを行った。上記記載の250 bpのプローブとハイブリダイズする最小のDNA断片として、図2に示すように約6、2 kbのXbaI断片が見いだされた。

【0025】(3)コロニーハイブリダイゼーションによるPDI遺伝子のクローニング

キャンディダ・ボイディニS2株のゲノムDNAを制限酵素XbaIで完全消化し、0.7%アガロースゲル電気泳動で分画した。6、2 kb付近のアガロースを切り出し、DNAセル（第一化学社製）を用いてDNA断片を回収した。XbaIで消化したpBluescript II SK+にこの回収したDNAを挿入し、大腸菌JM109株を形質転換してキャンディダ・ボイディニS2株のゲノムライブラリーを作成した。

【0026】このライブラリーを、上記250 bpのDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション法によってスクリーニングし、陽性のクローンを得た。ハイブリダイゼーションの条件は、上記のサザンハイブリダイゼーションの条件と全く同一である。陽性のクローンからプラスミドを回収し、挿入DNA断片の制限酵素地図を作成した。作成した制限酵素地図を図1に示す。この制限酵素地図をもとにサブクローニングを行い、PDI遺伝子を含むDNA断片をXbaIからSalIまでの約2 kb（図1中で左側）に限定した。

【0027】(4)塩基配列の決定

上記記載のXbaIからSalIまでの約2 kbのDNA断片の塩基配列を決定した。このDNA断片をファージM13に両方向にクローニングし、2本鎖DNA（RF）を各々調製した。これらの二本鎖DNAを大腸菌エキソヌクレアーゼIIIと反応させ、一方に向に欠失が導入された二本鎖DNAを調製した。エキソヌクレアーゼIIIを利用して一方に向に欠失挿入プラスミドの作成法に関しては、「統生化学実験講座、第1巻、遺伝子研究法II」の289-305頁に詳しく記載されている。

【0028】前記の方法により得られた一方に向に欠失が挿入された各二本鎖DNAを大腸菌JM109株に形質転換して、一方に向に欠失が挿入されたファージクローンを作成した。各ファージクローンから二本鎖DNAを調製して、制限酵素による切断パターンから欠失の程度を調べ、適当なクローンから一本鎖ファージDNAを調製した。これら一本鎖ファージDNAを鋸型として、ジデオキシ法（Sanger, F., et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463）によって塩基配列を決定した。各クローンの塩基配列をつなぎ合わせることによ

り、図1中XbaIサイトからSalIサイトの手前までの2.0 kbの塩基配列を決定した。

【0029】配列番号1に塩基配列と、塩基配列から導かれるPDIのアミノ酸配列を示した。C. boidiniiのPDIは、配列番号1の塩基配列番号367から1959番目までの塩基配列によってコードされたら31アミノ酸からなることがわかり、PDI1遺伝子と名付けた。PDI1のアミノ酸配列は、S. cerevisiae由来のPDIと45%、ヒトPDIと22%の同一性を示した。類似のアミノ酸を含めると、S. cerevisiaeのPDIと64%、ヒトPDIと49%の類似性を示した。

【0030】PDIのジスルフィド結合交換反応の活性中心として各種起源のPDIで保存されている配列、即ちCys-Gly-His-Cys（配列番号：4）が配列番号1の61から64番目のアミノ酸配列、および408から411番目のアミノ酸配列の2カ所に見いだされた。また、C末端に存在する小胞体保持シグナル配列は、Arg-Asp-Glu-Leu（配列番号：9）であり、S. cerevisiaeのPDIのHis-Asp-Glu-Leu（配列番号：3）や哺乳類のPDIに広く認められるLys-Asp-Glu-Leu（配列番号：2）とも異なる配列であった。

【0031】なお、プロテインジスルフィドイソメラーゼ活性の測定は、還元・変性・再酸化による方法で作成したスクランブルドリポスクレアーゼA（RNase A）の再構成への促進効果を見ることによって行うことができる。リボヌクレアーゼAの再構成の程度は、その酵素活性の回復の程度を指標として定量化する（特開平6-38771）。上記方法によりPDI活性を測定したところ、上記DNA断片を含有するメタノール酵母形質転換体が、表1に示すように対照とした形質転換していないメタノール酵母よりも高いプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有することが確認された。

【0032】実施例2、異種の目的タンパク質の分泌メタノール酵母C. boidinii由来のPDI1遺伝子と、糸状菌Arthromyces ramosus由来のペルオキシダーゼ（APR）遺伝子とを共発現することにより、APRの分泌量が増加することを確認した。なお、発現ベクターとして用いたpNOTe1およびAPR発現ベクターpNOTe1APRについて特開平5-344895に開示されている。

【0033】pNOTe1の栄養要求性マーカー（URA3）を、C. boidinii由来のLEU2遺伝子と交換することにより、pNOTe1とは異なる栄養要求性マーカーを持った発現ベクターを作ることが出来る。また、宿主メタノール酵母にこの2つの発現ベクターのマーカーに対応した栄養要求性を付与することにより、上記記載の2種の発現ベクターによる形質転換が可能である。メタノール酵母へ栄養要求性を付加する方法については、公知の方法（Sakai, Y. et al., (1991) J. Bacteriol., 173, 7458～7463）が利用できる。

【0034】(1)発現ベクターの構築

ARP 遺伝子を含む1.1 kbのEcoRI DNA 断片をプラスミドpNOTE1ARP から切り出し、pNOTE1のNot I サイトに挿入して、図3(a)に示したプラスミドpNP03を作成した。

【0035】PDI1遺伝子の発現のために、栄養要求性マーカーとしてLEU2遺伝子をもち、相同組み換え部位として*C. boidinii*のリボソームDNA(rDNA)をもつ発現ベクターを図4に示した手順で作成した。まず、pNOTE1をEcoRIとHind IIIで切断して、*C. boidinii*のアルコールオキシゲーゼ遺伝子(AOD1)のプロモーター・ターミネーターを含む2.0 kbのDNA断片を切り出し、pUC19のEcoRI-Hind III サイトに挿入して、プラスミドpNOT46を作成した。

【0036】*C. boidinii*由来のrDNAを含むDNA断片をPCRにより得、pNOT46のHindIIIサイトに挿入して、pNOT46Rを作成した。*C. boidinii*のLEU2遺伝子を含むプラスミドpCLEU321(Sakai, Y. and Tani, Y. (1992) J. Bacteriol., 174, 5988-5993.)を、EcoRIで消化して3.2 kb のLEU2遺伝子を含むDNA断片を切り出して平滑末端にした。この平滑末端化した3.2 kb のDNA断片を、NdeI消化後やはり平滑末端化したpNOT46Rに挿入して、pNL1を作成した。上記発現ベクターに組み込むために、PDI1遺伝子の両端にNotIサイトをPCR法によって作成した。

【0037】センスプライマーとして、

5'-ATAAGAATGCCCGCGCAAAATGAAGTTAACTAATTCAA-3' (配列番号: 10)

アンチセンスプライマーとして、

5'-ATAAGAATGCCCGCTTATAATTCACTAACGAAACATCA-3' (配列番号: 11)

を合成した。この2つのオリゴヌクレオチドの5'末端側にはNotIが認識する配列があり、これらのプライマーを用いて増幅されたDNA断片には、PDI1遺伝子の開始コドンの直前と終止コドンの直後にNotIサイトが形成されるようになっている。*C. boidinii*のゲノムDNAを鋸型にして、上記記載の2つのプライマーを用いてPCR反応を行い、増幅された1.6 kbのDNA断片をNotI消化後、プラスミドpBluescript SK+のNotIサイトに挿入して、pSKPDを作成した。pSKPDをNotI消化して得られる1.6 kbのDNA断片を、上記記載のpNL1のNotIサイトに挿入して、図3(b)に示すpNRPDを作成した。

【0038】(2) 形質転換酵母の作成

上記(1)に記載の発現ベクター2種を用いて、メタノール酵母*C. boidinii*の形質転換体を作成した。宿主に用いた菌株は、特開平5-344895において開示されている*C. boidinii*TK62(ura3)株の、LEU2遺伝子を破壊した*C. boidinii*BUL(ura3, leu2)である。*C. boidinii*のLEU2遺伝子については、Sakai, Y. and Tani, Y. (1992) J. Bacteriol., 174, 5988-5993)。*C. boidinii*の形質転換法の方法については、特開平5-344895において開示されている。

【0039】まず、ARP 遺伝子の形質転換体を作成した。上記記載のARP 発現ベクターpNP03をBam HI消化して直鎖状にした後、C. boidinii BUL(ura3, leu2)株を形質転換して、Ura3+で形質転換体を選択した。選抜された形質転換体の一つであるBP017株においては、図5、A)、B)に示すように、宿主酵母BUL株の染色体DNA上のura3部位と発現ベクターpNP03中のURA3部位との相同組み換えにより、ARP 遺伝子を含むpNP03の全領域がura3部位に組み込まれている。このことは、図5、C)に示すように、宿主BUL株および形質転換体BP017株のゲノムDNAをBglIIで消化した後、URA3遺伝子の全領域を含む3.3 kbのBamH-SalI DNA断片をプローブとして行ったザーザンハイブリダイゼーションにおいて、BUL株には5.5 kbの、BP017株には14.4 kbのハイブリダイズするバンドが認められることから確認された。

【0040】次に、上記記載のARP 遺伝子で形質転換した*C. boidinii* BP017( leu2 )株を宿主として、PDI1遺伝子の形質転換体を作成した。PDI1発現ベクターpNRP DをApaI消化により直鎖分子にした後、BP017( leu2 )株を形質転換して、Leu+で選択することによりBPP1株を取得した。BPP1株においては、図6、A)、B)に示すように、宿主酵母BP017株の染色体DNA上のrDNA部位と発現ベクターpNP03中のrDNA部位との相同組み換えにより、PDI1遺伝子を含むpNRPDの全領域がrDNA部位に組み込まれている。

【0041】図6、C)に示すように、BUL株、宿主BP017株および形質転換体BPP1株のゲノムDNAをHindIIIで消化した後、pSKPDをNotI消化して得られるPDI1遺伝子を含む1.6 kbのDNA断片をプローブとして行ったザーザンハイブリダイゼーションにおいて、BUL株およびBP017株からは12.6 kbの内在性のPDI1遺伝子を含む領域に由来するバンドが、BPP1株からは上記12.6 kbのバンド以外に発現ベクターpNRPDに由来する6.1 kbのバンドが認められることから、染色体DNAへのPDI1遺伝子の組み込みが確認された。

【0042】(3) 形質転換体の解析

ARP 遺伝子で形質転換したBP017株、ARP 遺伝子とPDI1遺伝子の両方で形質転換したBPP1株、および宿主として用いたBUL株からmRNAを抽出し、ノーザンハイブリダイゼーションによってPDI1遺伝子の発現量を調べた。メタノールを唯一炭素源とするYM培地(Sakai, Y., et al., (1981) J. Gen. Microbiol., 123, 365 ~ 396)で、30°C、48時間培養した上記3菌株の菌体から、ISOGEN(日本ジーン社製)によって全RNAを抽出し、BIOMAG mRNA精製キット(PerSeptive Diagnostics社)によって精製した。

【0043】精製したmRNAを1.1 %アガロースゲル(20 mM MOPS緩衝液、1 mM EDTA、2.2M ホルムアミドを含む)で電気泳動後、ナイロン膜にプロッティングした。

実施例1に記載のサザーンハイブリダイゼーションと全く同一の条件でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション用いたプローブは、上記記載のpSKPD由来の1.6 kbのNotI DNA断片を用いた。図7に示すように、PDI1遺伝子の強い発現がPDI1遺伝子で形質転換したBPP1株に認められ、内在性のPDI1遺伝子によると思われる弱い発現がBUL株およびBP017株に認められた。

【0044】上記3種の菌株をメタノールを唯一炭素源とするYM培地で30℃、48時間培養した後、菌体中のPDI活性を測定した。集菌した菌体を50 mM リン酸カリ緩衝液(pH 7.5)に懸濁し、2 mlのエッペンドルフチューブに移して、等量のジルコニウム・ビーズ(直徑 0.5 mm)を加えた。チューブをビーズ・ビーダー(モデル3110BX、バイオスペック社(Biospec Products))で30秒激しく攪拌後、30秒間氷冷するという操作を6回繰り返した。菌体破碎液を4℃、16,000 × g、5分間遠心し、上清の酵素活性を測定した。

【0045】PDI活性の測定はヒルソンらの方法(Hilson, D.A. et al. (1984) Methods Enzymol., 107, 281-

294)に従った。すなわち、最終1 mlの反応液中に、50 mMのリン酸カリ緩衝液(pH 7.5)、500 µgのスクランブルdRNase、0.01 mMのディチオスライトールを含む。反応液を10分間インキュベートした後、10 µlを抜き取り3 mlの0.25 mgの酵母RNAを含むTKM緩衝液(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、25 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>)を加え、30℃で2分間、260 nmでの吸収を紫外キュベット中で測定することにより、RNase活性を測定した。1ユニットのPDI活性を、1分間に1ユニットのRNase再活性化を触媒する酵素活性とした。ここで、1ユニットのRNase活性は、1分間に260 nmの吸収を1増大させる酵素量と定義した。

【0046】表1に示すように、菌体内のPDI活性は、PDI遺伝子で形質転換したBPP1株において、ARP遺伝子のみで形質転換したBP017株や宿主に用いたBUL株よりも、9倍以上高かった。

【0047】

【表1】

酵素	BUL	BP017	BPP1
PDI	<0.1*	<0.1*	0.896

\* BULとBP017は測定限界以下

【0048】(3) ARPの分泌発現  
ARP遺伝子で形質転換したBP017株、ARP遺伝子とPDI1遺伝子の両方で形質転換したBPP1株、および宿主として用いたBUL株を、メタノールを唯一炭素源とするYM培地で培養し、培養液中のARP活性を比較した。図8に示したように、ARP遺伝子とPDI1遺伝子を共発現させたBPP1株において、培養液中のARP活性は培養84時間目に最高値0.024 U/mlに達した。ARP遺伝子だけを発現させたBP017株では、培養液中のARP活性は培養48時間目に最高値0.002 U/mlに達したが、宿主に用いたBUL株の培養液中にはARP活性は全く検出されなかった。この結果から、PDI1遺伝子とARP遺伝子を共発現させることにより、ARPの分泌発現量が約10倍増大したことがわかった。

【0049】

【発明の効果】本発明により、メタノール酵母のPDI遺伝子が取得され、本遺伝子をメタノール酵母で大量発現させてPDI酵素を取得することが可能になった。ま

た、本遺伝子を目的分泌タンパク質遺伝子とメタノール酵母内で共発現させることにより、目的タンパク質の分泌効率、すなわち目的タンパク質の生産量を飛躍的に向上させることができた。

【0050】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2030

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ダノムDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

起源

生物名：Candida boidinii

株名：S2

配列

```

AGAGUGCTCT CCACTCACTC ATTATTCATC CAGTATCTCC TCCAAGGTTG TCAACAATT 60
CACTCACTTG CCTTGCTTJA CCATCTACTCA ATCGTTCA TTTACTCTG TATCATTC 120
CCATTTCATC ACTTTTTCAT ATCTAGTAAC AAATGTCTA AGCAACGATA ATCTTTCAGC 180
AGATTGGCTC TTCTTTGATT CAATTGATCTC TTCTAGAC AGATCACTGA CACGTAATA 240
CTTACATAGA TATATATATA TATATATGAA ATTACTTT CGTCATTACT CAATTGATTC 300
CATTAATAC ATTCTAGTA TAATATATTGA CTTAAATAT ATTTCACATAT ACACATAACA 360

```

TTTAAA ATG AAG TTA ACT AAT TTC AAA GTT ATT GCC ACA ATT CTT GCT Met Lys Leu Thr Asn Phe Lys Val Ile Ala Thr Ile Leu Ala	408
1 5 10	
TGT TTA ACA GTF GTT AGA GCT GAT GAT GGT GGT GCC ATT GCA TCT CCA Cys Leu Thr Val Val Arg Ala Asp Asp Gly Gly Ala Ile Ala Ser Pro	456
15 20 25 30	
GAT TCC GCT GTT GTT AAA TTA ACT GCT GAT TCA TTC GAA TCA TTC ATG Asp Ser Ala Val Val Lys Leu Thr Ala Asp Ser Phe Glu Ser Phe Met	504
35 40 45	
AAA GAA AAT CCA TTA GTC TTA GCT GAA TTT TTT GCT CCT TGG TGT GGT Lys Glu Asn Pro Leu Val Leu Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly	552
50 55 60	
CAT TGT AAA AGA TTG GGT CCT GAA TTT CAA GTT GCT GCT GAT AAA TTA His Cys Lys Arg Leu Gly Pro Glu Phe Glu Val Ala Ala Asp Lys Leu	600
65 70 75	
GTT GAA AAA GAT ATT AGA TTA GCT CAA ATT GAT TGT ACC GAA GAA AAA Val Glu Lys Asp Ile Arg Leu Ala Gln Ile Asp Cys Thr Glu Glu Lys	648
80 85 90	
GAT TTA TGT TCT TCT TAT GGT ATT AAA GGT TAC CCA ACT TTA AAA GTC Asp Leu Cys Ser Ser Tyr Gly Ile Lys Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Val	696
95 100 105 110	
TTT AGA GGT TAC GAA AAT GAA CCT TCT GAT TAT GCT GGT CAA AGA ACT Phe Arg Gly Tyr Glu Asn Glu Pro Ser Asp Tyr Ala Gly Gln Arg Thr	744
115 120 125	
TCA GAT TCA ATC ATT TCT TAT ATG GTT AAA CAA TCA ACC CCA CCT GTC Ser Asp Ser Ile Ile Ser Tyr Met Val Lys Gln Ser Thr Pro Pro Val	792
130 135 140	
TCC ATC GAT GAT GAT CTC TCA GAT ATC GAA GAT ACA ATT AAA GAA TCA Ser Ile Val Asp Asp Leu Ser Asp Ile Glu Asp Thr Ile Lys Glu Ser	840
145 150 155	
AAT GAT CCT GTC TTT ATT CAA GTC TTA CCA AAA GGT TCT AAA TCT GTT Asn Asp Pro Val Phe Ile Gln Val Leu Pro Lys Gly Ser Ser Val	888
160 165 170	
GAA GCC GGT AAC TCA ACT TTC TTT GAA ATC GCT AAT GGT TTA AGA GAT Glu Ala Gly Asn Ser Thr Phe Phe Glu Ile Ala Asn Gly Leu Arg Asp	936
175 180 185 190	
AAC TAC TCT TTT ATT TCA ACA ACA AGT ACT GAA TTC TCT TCA AAA TAC Asn Tyr Ser Phe Ile Ser Thr Thr Ser Thr Glu Phe Ser Ser Lys Tyr	984
195 200 205	
TTG AAA GGT ATT AAA AAA TCA GAT ACT CCA TCT TAT ATT CTC TTT AGA Leu Lys Gly Ile Lys Ser Asp Thr Pro Ser Tyr Ile Leu Phe Arg	1032
210 215 220	
CCA AAT GAA GAA TTG TCT GAT GCT TCA ATC TAT AAA TTT GAT GAA ATT Pro Asn Glu Glu Leu Ser Asp Ala Ser Ile Tyr Lys Phe Asp Glu Ile	1080
225 230 235	
GAT GAT ACT CAT TTA ATC GAA TTC TTA AAC GTT GAA TCA AAA CCT TTA Asp Asp Thr His Leu Ile Glu Phe Leu Asn Val Glu Ser Lys Pro Leu	1128
240 245 250	
TTC GGT GAA ATG GAT GGT TCT TCT TCA CAA TCT TAT ATG GAA ATG AAA Phe Gly Glu Met Asp Gly Ser Ser Phe Glu Ser Tyr Met Glu Met Lys	1176

255	260	265	270	
TTA CCA GCT TAT TAT TTC TAT AAT GAA ATC TCT GAA AAA GAT GCC				1224
Leu Pro Val Ala Tyr Tyr Phe Tyr Asn Glu Ile Ser Glu Lys Asp Ala				
275	280	285		
GTC TCT GAT GCC ATC AGT AAA TTA GCT AAA ACT CAT AGA GGT AAA GTT				1272
Val Ser Asp Ala Ile Ser Lys Leu Ala Lys Thr His Arg Gly Lys Val				
290	295	300		
AAT TTC GTT GGT TTA GAC GCT TCT AAA TAT GGT TTA CAC GCT AAG AAT				1320
Asn Phe Val Gly Leu Asp Ala Ser Lys Tyr Gly Leu His Ala Lys Asn				
305	310	315		
ATT AAC ATG AAG GAA GAA TTC CCT CTT TTC GCT ATT CAC GAT TTA GCA				1368
Ile Asn Met Lys Glu Glu Phe Pro Leu Phe Ala Ile His Asp Leu Ala				
320	325	330		
ACT GAA TTA AAA TAC GGT ATC TCC CAA GAT AAA CCA TTA GAT AAT AAA				1416
Thr Glu Leu Lys Tyr Gly Ile Ser Gln Asp Lys Pro Leu Asp Asn Lys				
335	340	345	350	
TTA ATT CCA AAA TTC GTT GAA GAT TTC GTT GCT GGT AAA TTA GAA GCA				1464
Leu Ile Pro Lys Phe Val Glu Asp Phe Val Ala Gly Lys Leu Glu Ala				
355	360	365		
ATC ATT AAA TCA GAA CCA ATC CCA GAA ACT CAA GAT TCT CCA GTT TAC				1512
Ile Ile Lys Ser Glu Pro Ile Pro Glu Thr Gln Asp Ser Pro Val Tyr				
370	375	380		
CAT TTA GTC GGT AAA GAA CAT GAT AAA ATT ATT ACC TCT GAT AAA GAT				1560
His Leu Val Gly Lys Glu His Asp Lys Ile Ile Thr Ser Asp Lys Asp				
385	390	395		
GTC TTA GTT AAA TAT TAC GCT CCA TGG TGT GGT CAC TGT AAA AAA TTA				1608
Val Leu Val Lys Tyr Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Lys Leu				
400	405	410		
GCT CCA GTC TTT GAA GAA TTA GCT GCT GTT TAT GAA TCA GTT CCT CCA				1656
Ala Pro Val Phe Glu Glu Leu Ala Ala Val Tyr Glu Ser Val Ala Pro				
415	420	425	430	
GGT AAA GTC TTA TTA GCT GAT TTA GAT CAT ACT GAA AAT GAT GTC ACC				1704
Gly Lys Val Leu Leu Ala Asp Leu Asp His Thr Glu Asn Asp Val Thr				
435	440	445		
GGT GIT CAC ATT GAA GGT TAC CCA ACT ATC GTC TTA TAC CCA GCC GAT				1752
Gly Val His Ile Glu Gly Tyr Pro Thr Ile Val Leu Tyr Pro Ala Asp				
450	455	460		
GGT TCA GAA CCA GTT GTT TAC GAA GGT AAC AGA TCT TCT GAA TCT TTC				1800
Gly Ser Glu Pro Val Val Tyr Glu Gly Asn Arg Ser Phe Glu Ser Phe				
465	470	475		
TCC GAT TTC ATT AAA GAA AAA GGT TCA TCA GGT GTT GAT GCT AAT GCA				1848
Ser Asp Phe Ile Lys Glu Lys Gly Ser Ser Gln Val Asp Ala Asn Ala				
480	485	490		
TTA AAA GAA CCT TAC CCA GAA GAA GGT ACT GAA GGT GCT CCA GTT GAT				1896
Leu Lys Glu Pro Tyr Pro Glu Glu Gln Thr Glu Gly Ala Pro Val Asp				
495	500	505	510	
CCA GAA TCA GTT GGT GAT GCT GAA AAA GAA GAT GAT TCT GCT GCT GAT				1944
Pro Glu Ser Val Gln Asp Ala Glu Lys Glu Asp Asp Ser Ala Ala Asp				
515	520	525		
GTT CGT GAT GAA TTA TAAACAGTA GAATTAATTAA TAAATTGATT AAATAGTCCT				1999

Val Arg Asp Glu Leu 530 531 CTAAAAATTAA ATTAAAAAT AATAAAAAAA A	2030
【0051】配列番号：2 配列の長さ：4 配列の型：アミノ酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：ペプチド 配列 Lys Asp Glu Leu	配列の長さ：7 配列の型：アミノ酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：ペプチド 配列 Pro Trp Gys Gly His Cys Lys
【0052】配列番号：3 配列の長さ：4 配列の型：アミノ酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：ペプチド 配列 His Asp Glu Leu	【0055】配列番号：6 配列の長さ：7 配列の型：アミノ酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：ペプチド 配列 Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His
【0053】配列番号：4 配列の長さ：4 配列の型：アミノ酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：ペプチド 配列 Gys Gly His Cys	【0056】配列番号：7 配列の長さ：29 配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：
【0054】配列番号：5 配列 CGGGAATTCC CWTGGTGYGG WCAYTGYAA	29
【0057】配列番号：8 配列の長さ：28 配列の型：アミノ酸 配列 CGCGGATCCT GWCRCACCA WGGDGCR	トポロジー：直鎖状 配列の種類：ペプチド
【0058】配列番号：9 配列の長さ：4 配列の型：アミノ酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：ペプチド 配列 ATAAGAATGC GGCGCGAAAA TGAAGTTAAC TAATTTCAA	28
【0060】配列番号：11 配列の長さ：38 配列の型：核酸 配列 ATAAGAATGC GGGCGCTTAT AATTCAATCAC GAACATCA	Arg Asp Glu Leu 【0059】配列番号：10 配列の長さ：40 配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：化学合成DNA トポロジー：直鎖状 配列の種類：化学合成DNA
【図面の簡単な説明】 【図1】図1はキャンディダ・ボイディニのPDI1遺伝子を含む6、2 k bのDNA断片の制限酵素地図、塩基配列を決定した部分、およびPDI1遺伝子の位置と方向を示す図である。	38 【図2】図2はC. beijerinckiiにおけるPDI遺伝子の存在を示すサザーンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。 【図3】図3(a)はARP遺伝子の発現ベクターpNPG3、および(b)はPDI1遺伝子の発現ベクターpNRPDの構成を

示す図である。

【図4】図4はPDI1遺伝子の発現ベクターpNRPDの作成の手順を示す図である。

【図5】図5はBP017株のゲノムDNAにARP遺伝子が組み込まれた状態を示す模式図、およびそれを確認したサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

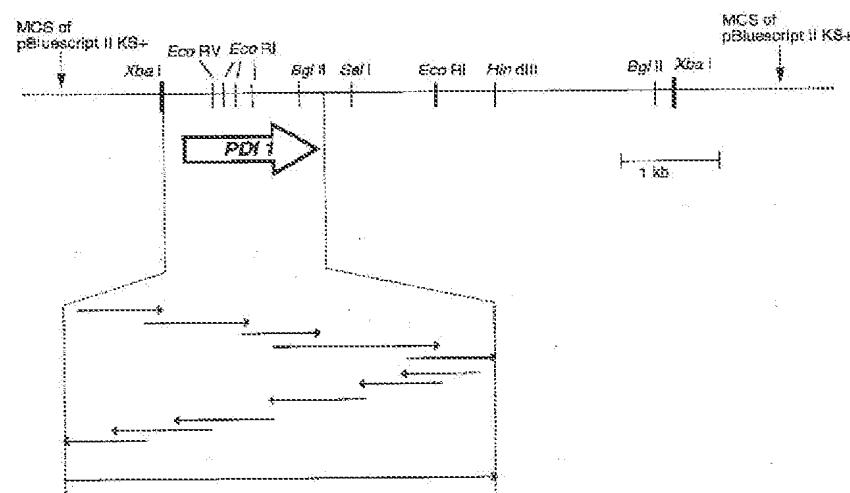
【図6】図6はBPP1株のゲノムDNAにPDI1遺伝子が組み

込まれた状態を示す模式図、およびそれを確認したサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

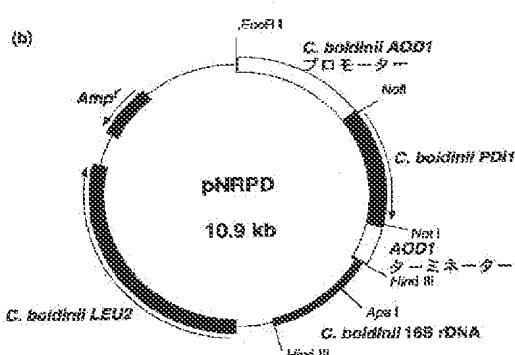
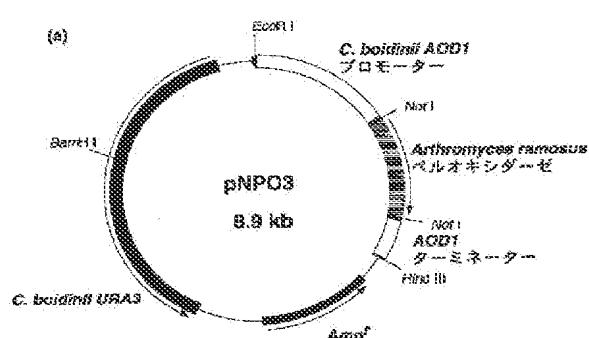
【図7】図7はPDI1遺伝子の発現量を解析したノザーン分析の結果を示す図である。

【図8】図8はBP017株、BPP1株、BUL株を培養したときの培養液中のARP活性を示す図である。

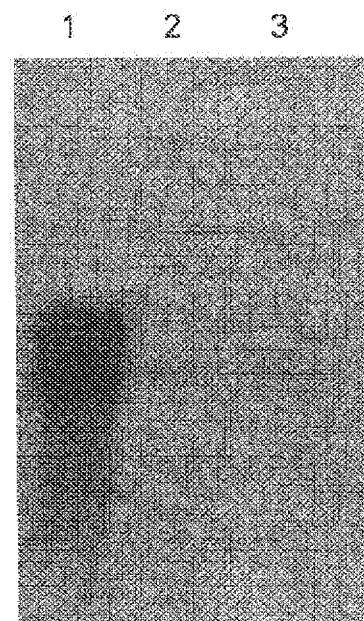
【図1】



【図3】



【図7】

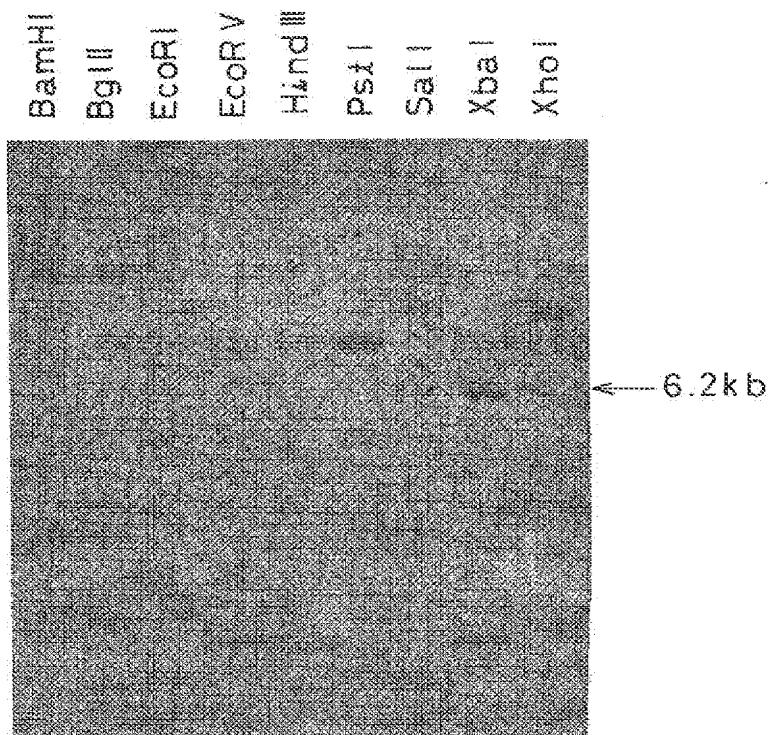


PDI

- 1 : BPP1株
- 2 : BP017株
- 3 : BUL株

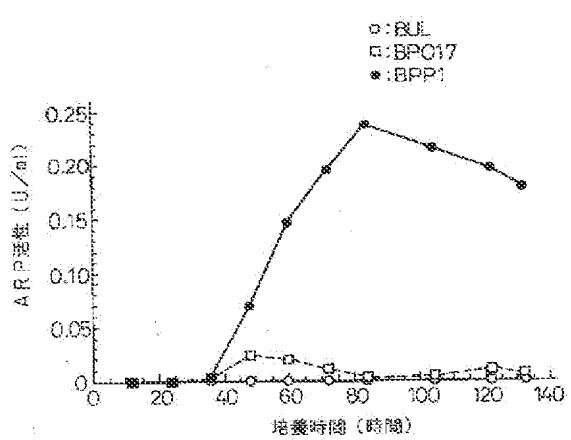
菌面代用写真

【図2】

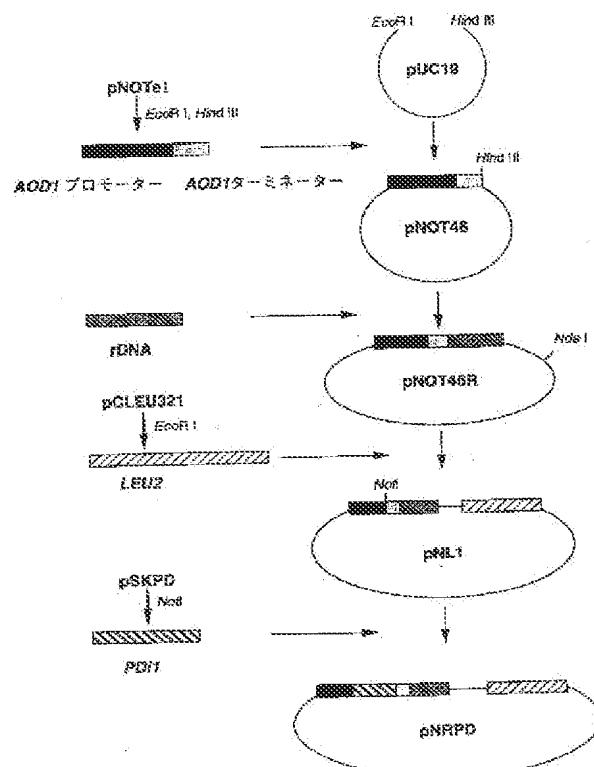


菌代用写真

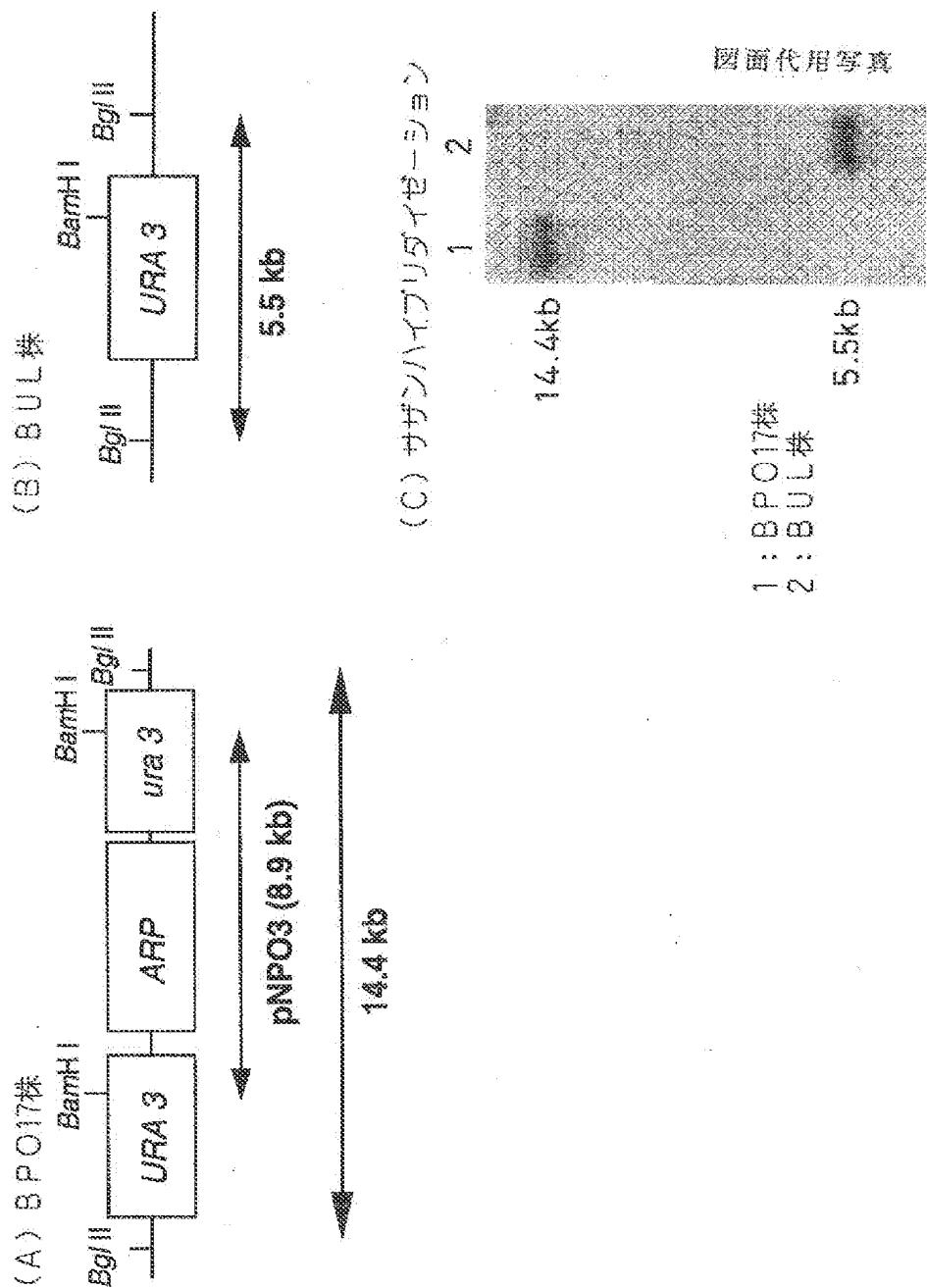
【図8】



[図4]

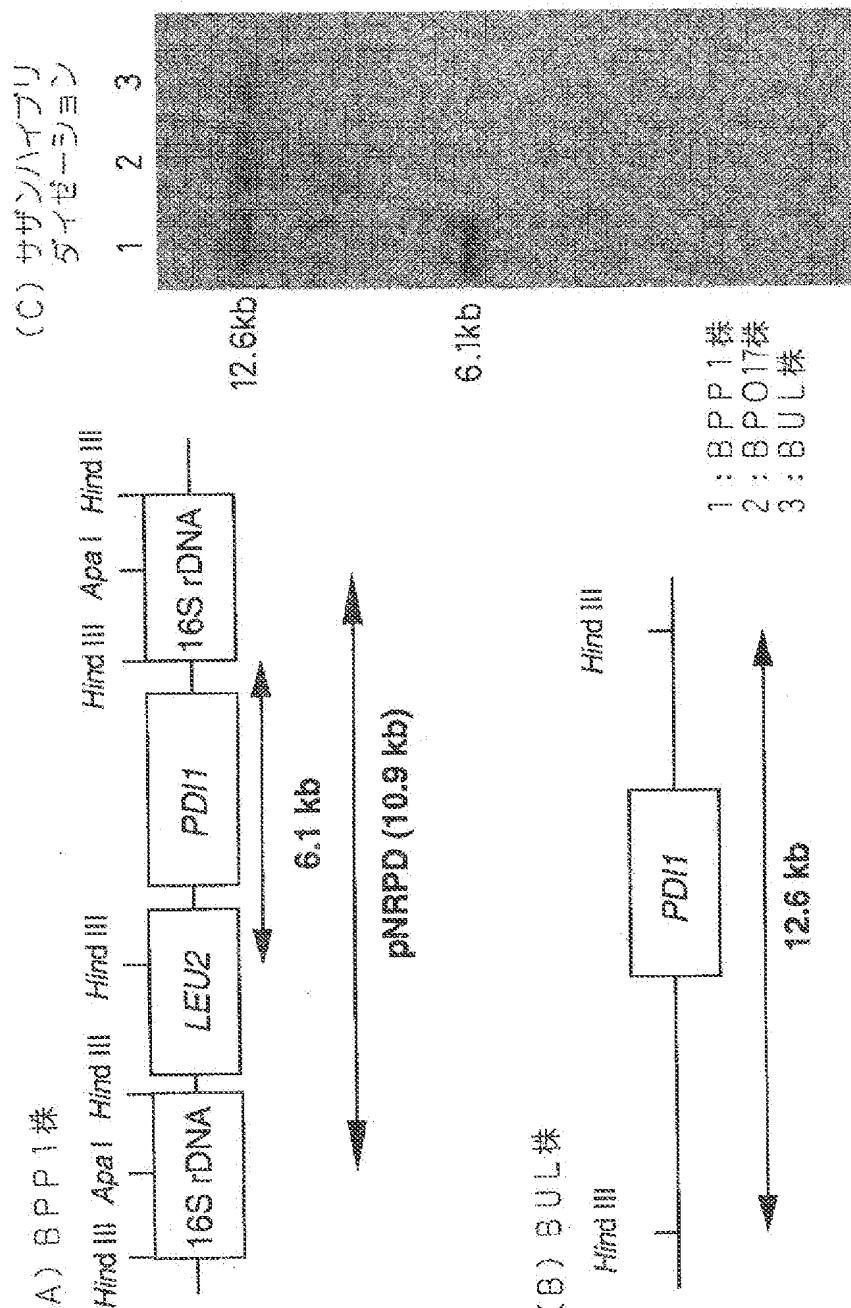


【図5】



【図6】

図面代替写真



フロントページの続き

(51)Int.Cl.5

識別記号

F.I

C 1 2 R 1:72)

(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:72)

( 1 6 )

特開平 1 0 - 1 2 7 2 9 4

(C 1 2 N 9/90  
C 1 2 R 1:72)